

飼料中添加益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物對點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 成長之影響

黃美瑩¹ · 朱惠真^{2*} · 曾亮瑋²

¹ 行政院農業委員會水產試驗所海洋漁業組

² 行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘要

本研究探討 *Leuconostoc mesenteroides* B4 對於胃酸、膽鹽與抗生素之耐受情形，並探究點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 餵飼 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖 (0.15%)、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g)、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.15%) 及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + 葡聚糖 (0.15%) 之飼料 8 週，對於魚隻成長及消化酵素活性之影響。結果顯示，*L. mesenteroides* B4 可以耐受 pH 2.0 及 1.0% 膽鹽，在測試 *L. mesenteroides* B4 對 15 種常用抗生素耐受性試驗中，除了對於 flumequine、oxolinic acid、penicillin G 及 sulphamethoxazole/trimethoprim 具抵抗力外，對於其餘 11 種抗生素均為敏感性。點帶石斑經分別餵飼 5 種不同飼料後，平均體重以 (3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組較高，且統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$)。點帶石斑經分別餵飼不同飼料後，增重率以 (3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組及 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組較高，且統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$)。消化酵素活性方面，點帶石斑餵飼 (3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組、(4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組飼料後，魚隻腸道內鹼性、中性及酸性蛋白酶活性均顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。點帶石斑餵飼 (2) 添加異麥芽寡糖及 (4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組魚隻腸道內脂肪酶活性顯著高於對照組 ($p < 0.05$)；而試驗組魚隻腸道內澱粉酶之活性均顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。以上結果顯示，點帶石斑飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物，有助於提升魚隻的成長。

關鍵詞：點帶石斑、益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4、異麥芽寡糖、葡聚糖、魚隻成長、消化酵素

前言

益生菌 (probiotics) 通常定義為用以提升宿主健康所使用的微生物，而水產的益生菌尚包括可以改善水質的微生物 (Nayak, 2010)。水產上所

使用益生菌的範圍較陸上動物為廣，而主要種類為芽孢桿菌、乳酸菌及酵母菌等 (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008)。水產的益生菌其功能包含下列幾項：增加營養及改進飼料消化性、提升生物免疫能力、與病原菌競爭進而排斥病菌、改善水質及抵抗病毒等。因此在水產養殖上使用益生菌可以 (1) 促進養殖生物成長、(2) 減少抗生素的濫用、(3) 降低養殖生物疾病之發生、(4) 增加抗病能力、(5) 減低死亡率及 (6) 改善養殖環境 (Garriques

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02)2463-3101 轉 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjeng@mail.tfrin.gov.tw

and Arevalo, 1995; Gatesoupe, 1999; Tucker and Kennedy, 2001; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Nayak, 2010)。

益生菌 (prebiotics) 是定義為非消化性的食物原料，此類原料可選擇性的刺激體內益生菌的生長，進而促進宿主健康；益生菌主要是非消化性的碳水化合物，主要是寡糖及聚糖等 (Gibson and Roberfroid, 1995)。研究報告指出，以益生菌作為飼料添加物可有效增進魚蝦類的成長及免疫能力，如：果寡糖 (fructo-oligosaccharides)、甘露寡糖 (mannan-oligosaccharides)、聚葡萄糖 (β -glucan)、果聚糖 (levan)、脂多糖 (lipopolysaccharide)、幾丁質 (chitin)、幾丁聚糖 (chitosan)、幾丁質及幾丁聚糖等，可增強鯉魚 (*Cyprinus carpio*)、青甘鱔 (*Seriola quinqueradiata*)、虹鱔 (*Oncorhynchus mykiss*)、野鯪 (*Labeo rohita*) 及斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 等水產生物成長及細菌性疾病的抵抗力 (Yano *et al.*, 1989; Matsuyama *et al.*, 1992; Jeney and Anderson, 1993; Itami *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1994; He *et al.*, 2003; Genc *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008)。

一般合益素 (synbiotic) 為結合使用益生菌及益生菌，其所產生效益通常比二者單獨使用效果的總和還高；飼料中添加甘露寡糖配合乳酸菌-糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)，可以增加虹鱔成長並活化免疫系統 (Rodriguez-Estrada *et al.*, 2009)。而牙鯪 (*Paralichthys olivaceus*) 飼餵含寡糖 (甘露寡糖、果寡糖) 及益生菌 *Bacillus clausii* 飼料後，發現二者對於成長及抗病力有加乘的效用 (Ye *et al.*, 2011)。飼料中添加果寡糖及 *B. subtilis* 不只提升大黃魚 (*Larimichthys crocea*) 的成長及飼料利用情形，也提高疾病抵抗力 (Ai *et al.*, 2011)。飼料中適量的幾丁聚糖及 *B. subtilis* 的添加，明顯提升海鱸 (*Rachycentron canadum*) 生長及抵抗病菌感染的能力 (Geng *et al.*, 2011)。飼料添加商業的合益素可增加虹鱔成長、存活率、血清總蛋白及白蛋白等，並能提升飼料效率 (Mehrabi *et al.*, 2012)。

有關現今市場應用較廣泛之聚糖與寡糖的來源，其中聚葡萄糖主要從真菌及酵母菌等微生物或部分藻類之細胞壁萃取純化 (Robertson *et al.*, 1994)；寡糖則是依原料不同而其製造方式也有所不同，除了大豆寡糖萃取自大豆，乳酮糖

(lactulose) 是利用化學合成外，其他寡糖多是使用酵素方式取得 (Nakakuki, 2005)，上述方式大多須要經過繁瑣之萃取及純化等步驟，取得較為不易，因此價格高昂，雖然作為養殖生物的免疫激活物之功效良好，因價位仍然偏高，因此推廣不易。

研究發現，有些益生菌在特殊醱類環境下會產生葡聚糖與寡糖，這些益生菌主要為 *Lactobacillus* spp.、*Leuconostoc* spp.、*Streptococcus* spp. 及 *Weissella* spp. 等，都是乳酸菌 (Leemhuis *et al.*, 2013)，此類乳酸菌在含蔗糖及麥芽糖培養環境下，利用本身分泌的葡聚糖蔗糖酶 (dextransucrase) 生物合成異麥芽寡糖 (isomaltooligosaccharide)，在含有蔗糖的之培養液中合成葡聚糖 (dextran) (Korakli and Vogel, 2006)。

異麥芽寡糖對人體有著良好的保健功效，包括：改善便秘 (Liu *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001)、增加體內益生菌 - 雙歧桿菌 (bifidobacteria) 的數量 (Kohmoto *et al.*, 1988, 1991; Cheng *et al.*, 2000)、預防齲齒 (Hamada *et al.*, 1984; Kanno, 1990)、還原消化代謝產物(如吲哚和對甲酚) (Liu *et al.*, 1994; Lin and Lee, 2005) 及降低血液中總膽固醇和三酸甘油酯 (Liu and Tsai, 1995; Wang *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005)。

家禽類攝食異麥芽寡糖後，顯著增加腸道內益生菌 - 雙歧桿菌 (bifidobacteria)，而減少壞菌 - 產氣莢膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) (Zhang *et al.*, 2003; Chung and Day, 2004)。白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 餵食 *Bacillus* OJ + 異麥芽寡糖 28 天後，試驗組對於白斑病毒 (white spot syndrome virus) 的抵抗力顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Li *et al.*, 2009)。斑節蝦餵食含 *Bacillus licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料 8 週，以病原菌-溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 攻擊後，試驗組的存活率顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2011)。

保健方面，葡聚糖可做為益生菌，增加體內益生菌 - 雙歧桿菌 (bifidobacteria) 及乳酸菌的數量 (Sarhini *et al.*, 2014; Tingirikari *et al.*, 2014; Kothari *et al.*, 2015a, b; Meybodi and Mohammadifar, 2015; Torino *et al.*, 2015; Caggianiello *et al.*, 2016)。Caggianiello *et al.* (2016) 報導，乳酸菌所產葡聚糖在益生菌與宿主之間相互作用，有助於益生菌對於腸道環境之耐受力，產葡聚糖的益生菌可以吸

附在腸道表皮，提升免疫調節能力。*Pedicoccus pentosaceus* CRAG 3 所產的葡聚糖具有抑制癌細胞及提高吞噬細胞之效果 (Shukla and Goyal, 2013)。*Leuconostoc mesenteroides* B-1149 所產的葡聚糖具有抑制子宮頸癌細胞及直腸癌細胞之功能 (Shukla *et al.*, 2014)。

自肉製品分離出的乳酸菌 *Lactobacillus sakei* MN1 及 *L. mesenteroides* RTF10 所產的葡聚糖 (1 mg/mL) 對於虹鱒的傳染性胰壞死病毒 (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) 及傳染性造血器官壞死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 均具有 50% 的抑制作用。動物試驗方面，餵食虹鱒予 *L. sakei* MN1 所產的葡聚糖 (50 µg) 3 天，可以降低虹鱒受 IPNV 及 IHNV 感染後的死亡率 (分別自 53.3% 降低為 6.5% 及 73.3% 降低為 20.0%) (Nácher-Vázquez *et al.*, 2015)。餵食鯉魚添加 0.2% Mito (含有 1 - 4% 葡聚糖) 的飼料 60 天，試驗組魚隻的成長明顯較對照組為佳 ($p < 0.05$) (Jaber and Masoumeh, 2017)。

乳酸菌為水產養殖常應用之益生菌，其中 *Leuconostoc* spp. 除了會產生寡糖與葡聚糖外，*L. mesenteroides* 也存在許多水產生物的腸道中，具備有作為益生菌的特點，在虹鱒、鮭魚 (Salmonids)、條紋鱧 (*Channa striatus*)、尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 及白蝦腸道中均曾分離出 *L. mesenteroides* (Balcázar *et al.*, 2007; Kosin and Rakshit, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Allameh *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2012; Zapata and Lara-Flores, 2012)，上述報導自水產生物腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 會產生抗菌物質，具有抑制多種水產病原菌，包括乳酸鏈球菌 (*Lactococcus garvieae*)、親水性產氣單胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、哈維氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 及海洋分枝桿菌 (*Mycobacterium marinum*) 等之效果。

黃等 (2017) 先前研究中述及自鱸魚腸道篩選出 *Leuconostoc mesenteroides* B4，該菌在特殊醱類條件下會產生寡糖與葡聚糖。*L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖之產物有助於增加白蝦成長、降低肝胰腺之弧菌數、提升免疫反應、抗腸炎弧菌感染及提高白蝦在腸炎弧菌攻擊後之存活率 (Huang *et al.*, 2017, 2018)。由於 *L.*

mesenteroides 為許多水產生物腸道中天然菌相之一，且具有抑制多種病原菌之功能，因此，*L. mesenteroides* 具有做為益生菌的特點，而其寡糖與葡聚糖產物具有作為免疫激活物之特性，結合該菌及其寡糖與聚糖產物的合益素在水產養殖應該有良好的發展潛力，不過，目前文獻上尚未有此類合益素組合於水產養殖的相關應用，因此本研究添加 *L. mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物於飼料中，探討其對於石斑魚隻成長及腸道消化酵素之影響，並探究 *L. mesenteroides* B4 之耐胃酸及膽鹽的情形與抗生素耐受性，以作為將來水產養殖應用之參考。

材料與方法

一、益生菌來源

具有合成葡聚糖及異麥芽寡糖能力之乳酸菌 - *L. mesenteroides* B4 係自大口黑鱸 (*Micropterus salmoides*) 腸道中分離篩選出來 (黃等, 2017)，*L. mesenteroides* B4 以 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS, Difco) 培養液培養。

二、益生菌耐胃酸及膽鹽之測試

將 Pepsin 溶液先以 0.22 µm 濾膜過濾，加入 pH 值分別為 1.0、2.0、2.5 及 3.0 之 MRS 培養液，最終濃度為 1000 units/mL。益生菌 *L. mesenteroides* B4 菌株先在 28°C 培養 24 hr，然後離心 (4000 × g, 10 min, 4°C)。將細胞收集後再懸浮於滅菌過的生理食鹽水 (0.85% NaCl)，接種 10⁶ CFU/mL 於上述不同 pH 之 MRS 培養液，然後於 28°C 培養 3 hr，於含有 0.15% β-glycero phosphate (Sigma) 的 MRS 平板上計數細菌數 (Oh *et al.*, 2000)。膽鹽的耐受程度測試 (Chung *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000) 係將菌株於 MRS 培養液 28°C 培養 24 hr，離心 (4000 × g, 10 min, 4°C)，收集細胞懸浮液於生理食鹽水中 (0.85% NaCl)，然後接種於含有 0.2、0.4、0.7 及 1.0% 膽酸 (oxgall, Difco) 的 MRS 培養液中，再於 28°C 培養 24 hr 後於 MRS 平板中計數。

三、益生菌對不同抗生素之耐受性試驗

參照 Bauer *et al.* (1966) 使用商業的抗生素，利用標準環片擴散法 (standard disc diffusion method) 進行。將益生菌於 MRS 培養液中於 28°C 培養 24 hr 時，以生理食鹽水調整益生菌液之吸光值至 McFarland 0.5 (菌數為 10^6 CFU/mL)，取調整後之菌液 100 μ l 均勻塗於 MRS 平板中，並分別貼上 15 種抗生素環片，在 28°C 培養 24 hr 後，測量環片周圍所出現的透明圈之大小 (cm)，以了解菌株對於該抗生素之敏感程度。

所測試的抗生素包含 10 種水產常用抗生素：ampicillin 25 μ g (Oxoid)、amoxicillin 25 μ g (Oxoid)、doxycycline 30 μ g (Oxoid)、erythromycin 15 μ g (Oxoid)、florfenicol 30 μ g (Oxoid)、flumequine 30 μ g (Oxoid)、lincomycin 10 μ g (Oxoid)、oxytetracycline 30 μ g (Oxoid) 和 oxolinic acid 2 μ g (Oxoid) 及 spiramycin 100 μ g (Oxoid)。5 種其他抗生素：ciprofloxacin 5 μ g (Oxoid)、penicillin G 10 unit (Oxoid)、sulphamethoxazole/trimethoprim 25 μ g (Oxoid)、tetracycline 30 μ g (Oxoid) 和 vancomycin 30 μ g (Oxoid)。

四、實驗用飼料之製作

(一) 益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖之製備

將益生菌 *L. mesenteroides* B4 接種於 MRS 培養液，於 28°C 震盪培養 36 hr，將得到菌數達 10^8 CFU/mL 以上的益生菌，做為飼料中益生菌的添加來源。

異麥芽寡糖與葡聚糖之製備方式主要參考 Korakli and Vogel (2006) 之方法，將益生菌 *L. mesenteroides* B4 接種於含 10% 蔗糖及 10% 麥芽糖之 MRS 培養液，28°C 震盪培養 36 hr，可得到含有益生菌及異麥芽寡糖之培養液，益生菌菌數達 10^8 CFU/mL 以上。將含有益生菌及異麥芽寡糖之培養液經離心 (9,000 \times g 30 min)，再以 0.22 μ m 無菌過濾膜 (nylon syringe filters, 13 mm; Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 過濾後，下層濾液做為飼料中異麥芽寡糖的添加來源。以 HPLC 分析估算所產異麥芽寡糖含量，將菌株培養液離心，取上澄液以 0.22 μ m 濾

膜過濾後，使用高效能液相色層分析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC; Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 檢測上澄液中的不同醣類 (Euzenat *et al.*, 1997)。本試驗使用高效能液相色層分析儀搭配 HPLC 管柱 Sugar-PakTM 1 (6.5 \times 300 mm column) 進行分析，並且以折射計 [refractive index (RI) detector; Waters, 2414] 為檢測器來檢測蔗糖、葡萄糖、果糖及寡糖等。溶析液為 50 mg/L EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)，流速為 0.5 mL/min，管柱溫度維持在 90°C。分析後之圖譜以 Breeze 軟體 (Waters) 計算出滯留時間對應各糖類之標準曲線，換算成蔗糖、葡萄糖、果糖及寡糖各組成含量。

益生菌 *L. mesenteroides* B4 接種於含 20% 蔗糖之 MRS 培養液，28°C 震盪培養 36 hr，得到含有益生菌及葡聚糖之培養液，益生菌菌數達 10^8 CFU/mL 以上，此益生菌及葡聚糖之培養液做為飼料中益生菌及葡聚糖的添加來源。

以重複乙醇沉澱及水洗估算葡聚糖產量，將細菌培養液離心後，加入 3 倍的冷乙醇 (99%)，於 4°C 放置隔夜後，於 4°C，10,000 \times g 離心 30 min，沉澱物為葡聚糖，再以蒸餾水溶解後重複乙醇沉澱及水洗步驟共 3 次，得到純化之葡聚糖，進行凍結乾燥 (EYELA Freeze Dryer FDU-2200; Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) 後稱重，以估算葡聚糖產量 (Shih *et al.*, 2005)。

(二) 實驗用飼料之製作

實驗飼料共有 5 組，分別為 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖 (0.15%)、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g)、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.15%) 及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + 葡聚糖 (0.15%)。由於益生菌 *L. mesenteroides* B4 及葡聚糖之培養液呈現黏稠狀，不易以簡單的離心方式完全分離，因此將益生菌 *L. mesenteroides* B4 及葡聚糖當作第 5 組。各組飼料製作方式如下：(1) 對照組係以未接種細菌之 MRS 培養液直接添加於商業飼料，添加比例為 1 kg 飼料添加 400 ml 培養液，以烘箱加熱乾燥 (45°C, 48 hr)。(2) 添加異麥芽寡糖組，以上述方式四、(一) 製備異麥芽寡糖液後，同對照組之比例添加於商業飼料中，以烘箱加熱乾燥 (45°C, 48 hr)。(3) 添

加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) 及 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組，以上述方式四、(一) 製備益生菌及異麥芽寡糖液，將分別含有益生菌 (3) 與益生菌及異麥芽寡糖 (4) 之培養液經離心 ($9,000 \times g$ 30 min)，上澄液加入飼料中以烘箱加熱乾燥 (45°C , 48 hr) 後，再添加離心後的益生菌，並以烘箱加熱乾燥 (30°C , 24 hr)，添加比例同對照組。(5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組，以上述方式四、(一) 製備益生菌及葡聚糖之培養液，同對照組之比例添加於飼料中，接著以烘箱加熱乾燥 (30°C , 24 hr)。

將上述各培養(菌)液添加在幼鰻配合飼料(福壽牌, 福壽實業股份有限公司, 台中, 臺灣) 並攪拌均勻, 以烘箱加熱乾燥飼料後, 再添加 5% 沙拉油於飼料表層, 以避免投餵魚隻後, 包覆在飼料外層之異麥芽寡糖、葡聚糖或益生菌迅速溶於水中。所製成之飼料於 4°C 冷藏 1 個月, 含益生菌組之飼料 (3、4 及 5 組) 每週取樣, 檢測飼料內益生菌殘存量, 在益生菌含量仍為 10^7 CFU/g 期限內投餵與石斑魚, 進行動物試驗。

五、益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻之生長研究

(一) 實驗動物

實驗所用之點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 購自民間養殖場, 蓄養於水產試驗所內循環 FRP 桶中 2 週, 水溫維持在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

(二) 益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚隻之生長研究

實驗共有 5 組, (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料。取體型大小約 14 g 的魚 300 隻進行實驗, 每缸 20 尾魚 3 重複, 隨機選取魚隻並放置於 15 座 82 L 大的玻璃缸。於每日上午 9 點及下午 5 點投餵飼料, 投餵量為魚隻體重的 2.0%, 實驗期間水溫控制在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 試驗共進行 8 週。

(三) 成長分析

成長實驗期間每 2 週量測魚隻體重一次, 測量當天不予餵食。分析增重率 (percent weight gain, PWG) 及飼料效率 (feed efficiency, FE)。

$$\text{PWG (\%)} = [(\text{最後體重}) - (\text{最初體重}) / (\text{最初體重})] \times 100\%$$

$$\text{FE} = (\text{最後體重}) - (\text{最初體重}) / \text{總飼料攝取量}$$

六、飼料中添加益生菌、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚類消化酵素活性之影響

魚隻餵食 5 組不同飼料 8 週後, 每缸採集 1 尾魚, 每組共採集 3 隻魚隻腸道, 分別進行消化酵素活性分析。採樣前魚隻禁食 48 hr 採樣後將魚隻以 75% 酒精進行表面殺菌, 以滅菌後之剪刀剪開魚隻腹部, 配合滅菌後之鑷子取出腸道, 秤重後剪成數小段, 加入定量無菌的生理食鹽水 (0.85% NaCl) 稀釋後, 以均質機 (T18 basic Ultra Turrax[®], IKA[®] Works Inc., Wilimington, NC, USA) 配合已滅菌之均質刀 (S18N-10 G Dispersing Tool, IKA[®] Works Inc.) 充分打碎, 加入 2 倍蒸餾水, 於 4°C 下, 以 $10,000 \times g$ 離心 10 min 後, 取上清液即為粗酵素抽取液, 供酵素分析用。

(一) 澱粉酶

澱粉酶的測定依據 Shan *et al.* (2009) 的方法, 以澱粉為基質, 將澱粉溶於 Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 6.7), 取定量粗酵素抽取液加入後於 28°C 反 30 min, 添加碳酸鈉與 DNS (dinitrosalicylic acid) 試劑, 於 100°C 加熱 15 min, 最後加入蒸餾水稀釋, 於 O.D. 550 nm 測定吸光值, 酵素比活性單位以 $\mu\text{g glucose/分鐘/毫克蛋白質}$ 表示。

(二) 中性/鹼性蛋白酶

中性/鹼性蛋白酶的測定依據 Alvarez-Gonzalez *et al.* (2006) 方法, 以酪蛋白為基質, 將酪蛋白溶於 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5 / pH 9.0), 取定量粗酵素抽取液加入後於 28°C 反應 30 min, 以 20% TCA (trichloroacetic acid) 溶液終止反應, 再以 $0.45 \mu\text{m}$ 濾膜過濾後, 於 O.D. 280 nm 測定吸光值, 酵素比活性單位以 $\mu\text{g tyrosine/分鐘/毫克蛋白質}$ 表示。

(三) 酸性蛋白酶

酸性蛋白酶的測定依據 Alvarez-Gonzalez *et al.* (2006) 方法，以血紅素為基質，將血紅素溶於 glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.0)，取定量粗酵素抽取液加入後於 28°C 反應 20 min，以 20% TCA 溶液終止反應，再以 0.45 μm 濾膜過濾後，測定 O.D. 280 nm 之吸光值，酵素比活性單位以 μg tyrosine/分鐘/毫克蛋白質表示。

(四) 脂肪酶

脂肪酶的測定依據 Pinsirodon and Parkin (2001) 方法，取定量粗酵素抽取液加入含 P-nitrophenol laurate 之 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 後，於 28°C 反應 15 min，以醋酸終止反應，於 O.D. 410 nm 測定吸光值，酵素比活性單位以 μg P-nitrophenol/分鐘/毫克蛋白質表示。

七、統計分析方法

各試驗結果以 SAS 套裝軟體 (Version 14.0) 進行變異數 (one way analysis of variance, ANOVA) 統計分析，測試各處理組間是否有顯著差異，所有試驗使用顯著水準為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

一、益生菌 *L. mesenteroides* B4 耐胃酸及膽鹽試驗

選擇乳酸菌作最益生菌時，主要是作為平衡腸道菌相的功能，因此最重要的考量因素是該乳酸菌之耐低 pH 及膽鹽的能力 (Kim and Austin, 2008)。*L. mesenteroides* B4 之耐胃酸試驗 (pH 1.0 - 3.0) 結果顯示，*L. mesenteroides* B4 在 pH 1.0 以下時，活存率低於 10%，pH 2.0 以上，活存率達 90% 以上 (Fig. 1)。自鮭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，於 pH 3.0 具有耐受性，且對於腸黏膜具有很強的附著力 (Balcázar *et al.*, 2006)。虹鱒腸道中分離的 *L. mesenteroides* 對於腸黏膜具有很強的附著力，可以在 pH 2.0 的環境下生長 (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。自條紋鱧腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，在 pH 3.0 的環境具有耐受性 (Allameh *et al.*, 2012)。自淡水魚中分離出的 *L.*

mesenteroides，可以在 pH 3.0 的環境下生長 (EI-Jeni *et al.*, 2015)。

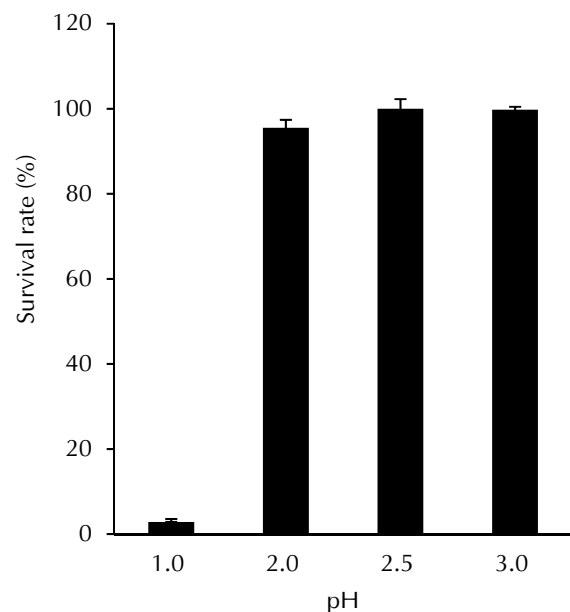


Fig. 1 Survival rates of *Leuconostoc mesenteroides* B4 after 3 hr of exposure to stimulated gastric fluid.

本研究 *L. mesenteroides* B4 可以在 pH 2.0 活存及生長，試驗結果與分離自鮭魚、虹鱒、紋鱧及淡水魚中的 *L. mesenteroides* 耐 pH 2.0 - 3.0 的結果相近 (Balcázar *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Allameh *et al.*, 2012; EI-Jeni *et al.*, 2015)，也推測 *L. mesenteroides* B4 被魚隻攝食後，在魚隻體內應該可以耐胃酸，通過胃前往腸道。

L. mesenteroides B4 之耐膽鹽試驗 (0.2 - 1.0%) 結果顯示，在含有 0.2 - 1.0% 膽鹽培養液中，該菌的活存率將近 100% (Fig. 2)。膽鹽耐受性是益生菌在腸道生長及活存的必備條件 (Axelsson, 2004)。自鮭魚腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，於 10% 魚隻的膽鹽具有耐受性 (Balcázar *et al.*, 2006)。虹鱒腸道中分離的 *L. mesenteroides* 對於腸黏膜具有很強的附著力，可以在 1.0% 膽鹽的環境下成長 (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。自條紋鱧腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，在 0.3% 膽鹽的環境具有耐受性 (Allameh *et al.*, 2012)。自淡水魚中分離出的 *L. mesenteroides*，可以在 2.0% 膽鹽的環境下成長 (EI-Jeni *et al.*, 2015)。

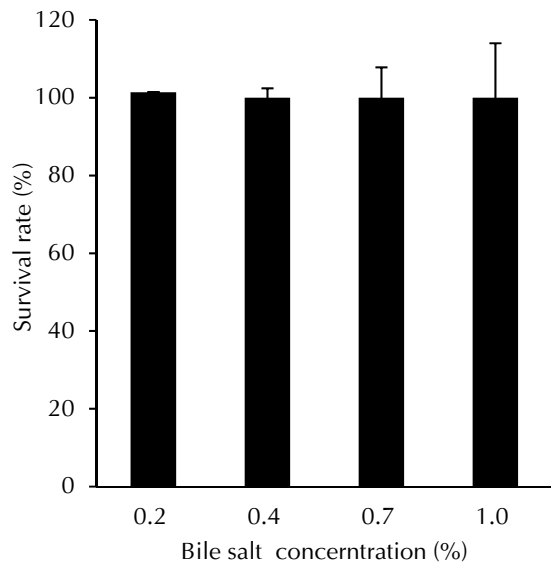


Fig. 2 Survival rates of *Leuconostoc mesenteroides* B4 after 12 hr of exposure to stimulated intestinal fluid.

本研究 *L. mesenteroides* B4 可以在 1.0% 膽鹽環境活存及生長，試驗結果與分離自鮭魚、虹鱒、條紋鱧及淡水魚中的 *L. mesenteroides* 耐 0.3 - 10% 膽鹽的結果相近 (Balcázar *et al.*, 2006; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011; Allameh *et al.*, 2012; EI-Jeni *et al.*, 2015)。益生菌可以耐受膽鹽表示，該益生菌應該可以在腸道生長及活存。

本研究 *L. mesenteroides* B4 可以耐受 pH 2.0 及 1.0% 膽鹽，推測 *L. mesenteroides* B4 被魚隻攝食後，在魚隻體內應該可以耐受胃酸，通過胃前往腸道。

二、對不同抗生素之耐受性試驗

L. mesenteroides B4 菌株在 ampicillin、doxycycline、erythromycin、florfenicol、oxytetracycline 及 spiramycin 所產生之抑菌圈分別為 1.1、1.1、1.8、1.1、1.0 及 1.2 cm (Table 1)，在 amoxicillin、lincomycin、ciprofloxacin、tetracycline 及 vancomycin 所產生之抑菌圈分別為 0.7、0.9、0.6、0.9 及 0.6 cm (Table 1)。在 flumequine、oxolinic acid、penicillin G 及 sulphamethoxazole/trimethoprim 抑菌圈均為 0。

由以上資料可知，*L. mesenteroides* B4 菌株在所測試的 15 種抗生素中，對 flumequine、oxolinic acid、penicillin G 及 sulphamethoxazole/

trimethoprim 等 4 種具有抵抗能力，對其他 11 種抗生素均有敏感性 (4/15)。

Table 1 Antibiotic susceptibilities of *Leuconostoc mesenteroides* B4

Antibiotic	Diameter of inhibitory zone (cm)	
Common use		
Ampicillin	25 µg	1.1
Amoxicillin	25 µg	0.7
Doxycycline	30 µg	1.1
Erythromycin	15 µg	1.8
Florfenicol	30 µg	1.1
Flumequine	30 µg	0
Lincomycin	10 µg	0.9
Oxytetracycline	30 µg	1.0
Oxolinic acid	2 µg	0
Spiramycin	100 µg	1.2
Others		
Ciprofloxacin	5 µg	0.6
Penicillin G	10 unit	0
Sulphamethoxazole/trimethoprim	25 µg	0
Tetracycline	30 µg	0.9
Vancomycin	30 µg	0.6

自虹鱒腸道中分離出的 *L. mesenteroides*，以 21 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌對 14 種有抵抗性，對其餘 7 種均為敏感性 (14/21) (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。分離自條紋鱧腸道的 *L. mesenteroides* 以 7 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌對 1 種有抵抗性，對其餘 6 種均為敏感性 (1/7) (Allameh *et al.*, 2012)。自淡水魚中分離出的 *L. mesenteroides*，以 10 種抗生素試驗其感受性，結果顯示，該菌 4 種有抵抗性，對其餘 6 種均為敏感性 (4/10) (EI-Jeni *et al.*, 2015)。

一般認為 *Leuconostoc* spp. 對於 vancomycin 是呈現抵抗性 (Kelly *et al.*, 1995)，自虹鱒腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 對於 vancomycin 是呈現抵抗性 (Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)；而自淡水魚中分離出的 *L. mesenteroides* 對於 vancomycin 是呈現敏感性 (EI-Jeni *et al.*, 2015)。本研究顯示，*L. mesenteroides* B4 則是對於 vancomycin 是呈現敏

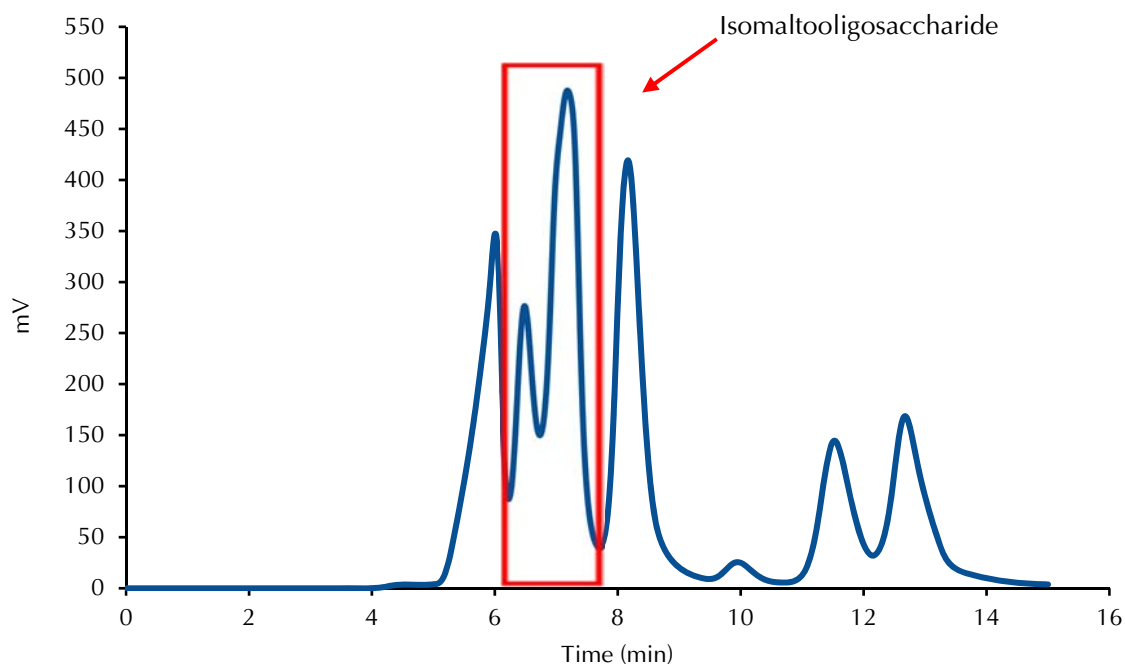


Fig. 3 Chromatogram of isomaltooligosaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* B4 after 36 hr of incubation (28°C) in medium supplemented with sucrose and maltose. Column, Sugar-Pak™ 1; temperature, 90°C; eluent, 50 mg/L EDTA; flow rate, 0.5 mL/min; injection, 20 µL; refractometric detection.

感性，與自淡水魚中分離出 *L. mesenteroides* 的結果一致 (EI-Jeni *et al.*, 2015)，與一般認知 *Leuconostoc* spp. 對於 vancomycin 是呈現抵抗及虹鱒腸道中分離出的 *L. mesenteroides* 的結果不同 (Kelly *et al.*, 1995; Pérez-Sánchez *et al.*, 2011)。

為了避免抵抗抗生藥的基因經由質體或基因成份轉移到其他細菌，導致具有抗藥性的菌株出現，因此，近幾年來，建議使用的益生菌應該以比較不具抗生藥抗性的菌種為宜 (Saarela *et al.*, 2000; EFSA, 2012)。本研究 *L. mesenteroides* B4 菌株在所測試的 15 種抗生藥中，對 4 種抗生藥具有抵抗能力，對其他 11 種抗生藥均有敏感性，該菌對於不同抗生藥抵抗的種類之比例 (4/15) 低於前述文獻所報導的 *L. mesenteroides* (14/21 及 4/10)，比較符合建議使用的益生菌應該以比較不具抗生藥抗性的菌種為宜之規範 (Saarela *et al.*, 2000; EFSA, 2012)。

此外，歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 將 *L. mesenteroides* 列為合格安全推定 (Qualified Presumption of Safety, QPS) 內的安全菌株，可以應用於食品及飼料 (EFSA,

2011)。又，研究顯示，*L. mesenteroides* 對於虹鱒沒有不良影響 (Vendrell *et al.*, 2008)。

三、含益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖飼料之製備

將益生菌 *L. mesenteroides* B4 接種於 MRS 培養液，培養後菌數達 10^8 CFU/mL。將 *L. mesenteroides* B4 接種於含 10% 蔗糖及 10% 麥芽糖之 MRS 培養液 28°C 震盪培養 36 hr，得到含有益生菌及異麥芽寡糖之培養液，益生菌菌數達 10^8 CFU/mL 以上，依據 HPLC 分析結果顯示，培養液中產生約 50 mg/mL 異麥芽寡糖 (Fig. 3)。而將 *L. mesenteroides* B4 接種於含 20% 蔗糖之 MRS 培養液 28°C 震盪培養 36 hr，得到含有益生菌及葡聚糖之培養液，益生菌菌數達 10^8 CFU/mL 以上，將細菌培養液離心後，重複乙醇沉澱及水洗，得到純化之葡聚糖約 50 mg/mL (數據未顯示)。

實驗飼料共有 5 組，分別為 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖 (0.15%)、(3) 添加益生菌 *L.*

Table 2 Bacterial survival count of feed supplemented with *Leuconostoc mesenteroides* B4, *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide, and *L. mesenteroides* B4 + dextran during storage at 4°C (CFU/g)

Week	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B4	<i>L. mesenteroides</i> B4 + isomaltooligosaccharide	<i>L. mesenteroides</i> B4 + dextran
0	3.70×10^7	6.50×10^7	6.00×10^7
1	2.90×10^7	5.20×10^7	4.90×10^7
2	2.15×10^7	3.60×10^7	3.20×10^7
3	1.92×10^7	3.14×10^7	3.00×10^7
4	1.70×10^7	2.86×10^7	2.83×10^7

mesenteroides B4 (10^7 CFU/g)、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.15%) 及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + 葡聚糖 (0.15%)。所製成之飼料於 4°C 冷藏 1 個月，含益生菌組之飼料 (3、4 及 5 組) 每週取樣，檢測飼料內益生菌殘存量。結果顯示，含益生菌組之飼料，(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組於 4°C 冷藏 1 個月後，菌數仍能維持 10^7 CFU/g (Table 2)，符合預設飼料含益生菌量 10^7 CFU/g 的標準，因此動物試驗期間，所製飼料於 4°C 冷藏 1 個月內使用。添加益生菌 *Lactococcus lactis* 的飼料 (10^8 CFU/g) 於 4°C 冷藏 1 個月後，飼料中益生菌之菌數仍維持在 $10^7 - 10^8$ CFU/g (Sun *et al.*, 2012)，菌數在 4°C 冷藏 1 個月後仍維持在 10^7 CFU/g，與本研究類似。

四、石斑魚飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖飼料對於魚隻成長影響情形

點帶石斑分別飼飼 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料 8 週，各組魚隻之平均體重自 14.89 - 14.96 g 分別增加為 42.78 g、43.21 g、44.13 g、44.74 g 及 43.98 g (Table 3)，在統計上 (2) 添加異麥芽寡糖組與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$)；(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組及 (5) 添加益生

菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組則顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。而各組之平均增重率分別為 187.10% (對照組)、188.76% (異麥芽寡糖組)、195.53% (添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組)、200.58% (添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組) 及 194.55% (添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組) (Table 3)，(2) 添加異麥芽寡糖組與對照組相近，(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組高於對照組，但在統計上 (2) 添加異麥芽寡糖組及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$)；(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組及 (4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組則顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。而飼料效率方面，分別為 0.89 (對照組)、0.92 (異麥芽寡糖組)、0.93 (添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 組)、0.95 (添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組) 及 0.95 (添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組)，雖然試驗組魚隻飼料效率與對照組在統計上無明顯差異 ($p > 0.05$)，但試驗組魚隻飼料效率有高於對照組的趨勢 (Table 3)。

裏海鱒 (*Acipenser persicus*) 飼飼 *L. mesenteroides* (2×10^9 CFU/g) 50 天後，魚隻成長明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Askarian *et al.*, 2011)。虹鱒飼食 *L. mesenteroides* 合併 *Lactobacillus plantarum* (10^7 CFU/g) 30 天後，魚隻成長與對照組並無明顯差異 ($p > 0.05$)，但是，試驗組對於病原菌 *Lactococcus garvieae* 的抵抗力明顯增加 (Vendrell *et al.*, 2008)。點帶石斑飼食添加益生菌

Table 3 Respective growth performances of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed with control, isomaltooligosaccharide (0.15%), *Leuconostoc mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g), *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + isomaltooligosaccharide (0.15%), and *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + dextran (0.15%) supplemented diets for 8 weeks

	Dietary				
	Control	Isomalto-oligosaccharide	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B4	<i>L. mesenteroides</i> B4 + isomalto-oligosaccharide	<i>L. mesenteroides</i> B4 + dextran
Initial weight (g)	14.90 ± 0.02 ^a	14.96 ± 0.09 ^a	14.93 ± 0.05 ^a	14.89 ± 0.05 ^a	14.93 ± 0.01 ^a
Final weight (g)	42.78 ± 0.74 ^a	43.21 ± 0.56 ^a	44.13 ± 0.30 ^b	44.74 ± 0.35 ^b	43.98 ± 0.55 ^b
PWG ¹	187.10 ± 4.77 ^a	188.77 ± 4.31 ^a	195.53 ± 0.92 ^b	200.58 ± 2.40 ^b	194.55 ± 3.08 ^{ab}
FE ²	0.89 ± 0.09 ^a	0.92 ± 0.14 ^a	0.93 ± 0.11 ^a	0.95 ± 0.09 ^a	0.95 ± 0.02 ^a

¹PWG: percent weight gain.

²FE: Feed efficiency.

Values in the same row with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

Lactococcus lactis 的飼料 (10^8 CFU/g) 60 天後，魚隻成長與對照組並無明顯差異 ($p > 0.05$)，但是飼料效益明顯較對照組增加 ($p < 0.05$) (Sun *et al.*, 2012)。本研究點帶石斑飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 的飼料 8 週後，魚隻成長明顯高於對照組 ($p < 0.05$)，與鱒魚飼食 *L. mesenteroides* 後，魚隻成長明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Askarian *et al.*, 2011) 之結果一致。又，本研究點帶石斑飼食益生菌 *L. mesenteroides* B4 的添加量為 10^7 CFU/g，Askarian *et al.* (2011) 為 10^9 CFU/g，為本試驗之 100 倍，可見本研究 *L. mesenteroides* B4 添加的效果較佳；乳酸菌目前市面上的價格約為 1 萬元/公斤左右，能夠使用較低添加量就可以達到良好效果，是節省益生菌成本之一大利基。本研究中試驗組魚隻飼料效率雖然有高於對照組的趨勢，但與對照組在統計上無明顯差異 ($p > 0.05$)，此結果與 Sun *et al.* (2012) 的結果不同。

目前探討飼食葡聚糖對於水產生物成長之影響的相關研究並不多；鯉魚添加 0.2% Mito (含有 1 - 4% 葡聚糖) 的飼料 60 天，試驗組魚隻的成長明顯佳於對照組 ($p < 0.05$)，飼料轉換率 (Feed conversion ratio, FCR) 明顯低於對照組 ($p < 0.05$) (Jaber and Masoumeh, 2017)。由於本研究益生菌 *L. mesenteroides* B4 產生葡聚糖後之培養液呈現黏稠狀，不易以簡單的離心方式完全分離，因此沒有單

獨的葡聚糖之組別，而將益生菌 *L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖產物當作第 5 組。本研究點帶石斑飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖的飼料 8 週後，魚隻成長明顯高於對照組 ($p < 0.05$)，與鯉魚飼食添加葡聚糖後，魚隻成長明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Jaber and Masoumeh, 2017) 之結果一致，但本研究點帶石斑飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖的飼料後，雖然飼料效率有提升，但與對照組在統計上並沒有顯著差異 ($p > 0.05$)，與該研究不同。

有關討論水產生物飼食異麥芽寡糖對於成長影響的相關研究尚缺乏。豬隻飼食含 0.2 - 0.8% 異麥芽寡糖之飼料 28 天，試驗組豬隻成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$)，而且隨著異麥芽寡糖添加量的增加，豬隻成長呈現正相關，此外，豬隻腹瀉的情形也隨著異麥芽寡糖添加量的增加明顯減少 ($p < 0.05$) (Wang *et al.*, 2016)。蛋雞飼食含 1.0% 異麥芽寡糖之飼料 32 週，試驗組雞隻成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$)，而且試驗組雞隻的產蛋率及所產雞蛋之重量均明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Tang *et al.*, 2017)。但本研究點帶石斑飼食添加異麥芽寡糖飼料對於魚隻成長並沒有顯著提升之效果，與 Wang *et al.* (2016) 及 Tang *et al.* (2017) 之結果不同，推測原因可能是陸上動物與水產生物之差異或是本實驗添加劑量 (0.15%) 較低所致。

有關水產生物攝食果寡糖及甘露寡糖對於成長影響之研究較多，大鯮鱗 (*Psetta maxima*) 仔魚餵食含 2.0% 果寡糖之飼料，試驗組魚隻成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$) (Mahious *et al.*, 2006)。尖吻鱸 (*Lates calcarifer*) 餵食含 1.0% 果寡糖之飼料 45 天，試驗組魚隻成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$) (Syed Raffic Ali *et al.*, 2017)。

歐洲海鱸 (*Dicentrarchus labrax*) 分別餵食添加 0.2% 及 0.4% 的甘露寡糖 67 天，添加甘露寡糖組魚隻的成長明顯較對照組佳 ($p < 0.05$) (Torrecillas *et al.*, 2007)。虹鱔攝食添加 0.2% 甘露寡糖的飼料 42 天，試驗組虹鱔成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$) (Staykov *et al.*, 2007)。餵食虹鱔添加 0.15% 甘露寡糖之飼料 90 天，試驗組魚隻成長明顯較對照組佳 (Yilmaz *et al.*, 2007)。

一般合益素為結合使用益生菌及維生素，其所產生效益通常比二者單獨使用效果的總和還高，白蝦攝食含有 0.2% 異麥芽寡糖及 *Bacillus* sp. NP5 (10^8 CFU/g) 之飼料 32 天，試驗組白蝦成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$)，對於弧菌感染後的抵抗力也明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Zubaidah *et al.*, 2015)。蛋雞餵食含 1.0% 異麥芽寡糖及 0.1% 多種乳酸菌及麴菌之飼料 32 週，試驗組雞隻成長顯著佳於對照組 ($p < 0.05$)，而且試驗組雞隻的產蛋率及所產雞蛋之重量均明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Tang *et al.*, 2017)；本研究點帶石斑餵食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4+ 異麥芽寡糖的飼料 8 週後，魚隻成長明顯高於對照組 ($p < 0.05$)，與 Zubaidah *et al.* (2015) 及 Tang *et al.* (2017) 之結果一致。

有些文獻探討合益素影響水產生物主要著重於免疫方面，白蝦餵食 *Bacillus* OJ+ 異麥芽寡糖 28 天後，試驗組對於白斑病毒的抵抗力顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Li *et al.*, 2009)。斑節蝦餵食含 *Bacillus licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料 8 週，以溶藻弧菌攻擊後，試驗組的存活率顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2011)。

此外，研究指出，飼料中添加甘露寡糖配合乳酸菌 - 糞腸球菌，可以增加虹鱔成長並活化免疫系統 (Rodriguez-Estrada *et al.*, 2009)。而牙鯧飼餵含寡糖 (甘露寡糖、果寡糖) 及益生菌 (*Bacillus*

clausii) 飼料後，對於成長及抗病力有加乘的效用 (Ye *et al.*, 2011)。飼料中添加果寡糖及 *B. subtilis* 提升大黃魚的成長及飼料利用情形，也提高疾病抵抗力 (Ai *et al.*, 2011)。而飼料中適量的幾丁聚糖及 *B. subtilis* 的添加，明顯提升海鱸生長及抵抗病菌感染的能力 (Geng *et al.*, 2011)。飼料中添加果寡糖配合糞腸球菌，可以增加鯉魚成長 (Mahghani *et al.*, 2014)。飼料添加商業的合益素可增加虹鱔成長、活存率、血清總蛋白及白蛋白等，並能提高飼料效率 (Mehrabi *et al.*, 2012)。

近年來，有應用多種益生菌及維生素於水產生物之研究漸多，鯉魚飼餵添加 0.15% 益生菌及維生素的飼料 8 週，其中益生菌含有芽孢桿菌及多種乳酸菌，維生素為甘露寡糖及聚葡萄糖，試驗組魚隻的成長及活存率明顯佳於對照組 ($p < 0.05$) (Mehrabi *et al.*, 2018)。飼餵鯉魚添加 0.15% 益生菌 (含有芽孢桿菌+多種乳酸菌) 及 0.05% 維生素 (mannan oligosaccharide + glucan) 的飼料 8 週，試驗組魚隻的成長及活存率明顯佳於對照組 ($p < 0.05$) (Barari *et al.*, 2015)。葡聚糖與聚葡萄糖均為葡萄糖之聚合物，前者葡萄糖之間的鍵結為 α 型態，後者為 β 型態，葡萄糖之間的鍵結之差異是否影響對於魚隻成長之效益，有待探討。

目前應用益生菌及維生素之合益素於水產生物之研究，大部分是選定特定的益生菌再另外加上聚糖或寡糖，有關現今市場應用較廣泛之聚糖與寡糖的來源，其中聚葡萄糖主要從真菌及酵母菌等微生物或部分藻類之細胞壁萃取純化；大部分的寡糖是使用酵素方式自多糖或其他醣類取得，上述方式大多須要經過繁瑣之萃取及純化等步驟，取得較為不易，因此價格高昂；本試驗利用 *L. mesenteroides* B4 在特殊醣類條件下會產生寡糖與葡聚糖，在 *L. mesenteroides* B4 發酵期間就同時生物合成異麥芽寡糖與葡聚糖，因此發酵的產物就含有益生菌及異麥芽寡糖與葡聚糖的維生素，而本研究顯示，點帶石斑攝食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、益生菌 *L. mesenteroides* B4+ 異麥芽寡糖或益生菌 *L. mesenteroides* B4+ 葡聚糖組飼料，有助於魚隻之成長，因此應用 *L. mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物，為提升水產養殖成效之良好選擇。

Table 4 Respective specific protease activities (U/mg protein) in the intestines of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed with control, isomaltooligosaccharide (0.15%), *Leuconostoc mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g), *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + isomaltooligosaccharide (0.15%), and *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + dextran (0.15%) supplemented diets for 8 weeks

Treatment	Alkaline protease	Neutral protease	Acid protease
Control	1.09 ± 0.08 ^a	1.18 ± 0.22 ^a	0.77 ± 0.09 ^a
Isomaltooligosaccharide	1.10 ± 0.24 ^a	1.63 ± 0.38 ^{ab}	0.77 ± 0.12 ^a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B4	2.36 ± 0.21 ^b	2.29 ± 0.67 ^b	1.07 ± 0.05 ^b
<i>L. mesenteroides</i> B4 + isomaltooligosaccharide	2.61 ± 0.28 ^b	2.89 ± 0.35 ^b	1.16 ± 0.16 ^b
<i>L. mesenteroides</i> B4 + dextran	2.49 ± 0.46 ^b	2.38 ± 0.27 ^b	1.07 ± 0.13 ^b

Values in the same column with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

五、飼料中添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖對於魚類消化酵素活性之影響

點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 葡聚糖飼料 8 週，各組鹼性蛋白酶分別為 1.09、1.10、2.36、2.61 及 2.49，其中以 (3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 麥芽寡糖及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 聚糖三組較高，統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 4)。各組中性蛋白酶分別為 1.18、1.63、2.29、2.89 及 2.38，統計上(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖三組與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 4)。各組酸性蛋白酶分別為 0.77、0.77、1.07、1.16 及 1.07，亦以(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖三組，在統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 4)。點帶石斑餵飼 (3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組飼料後，魚隻腸道內鹼性、中性及酸性蛋白酶活性均高於對照組 ($p < 0.05$)。推測益生菌 *L. mesenteroides* B4、益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖與 益生菌 *L.*

mesenteroides B4 + 葡聚糖均對點帶石斑之蛋白質消化能力有提升之效果。

點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料 8 週，各組魚隻腸道之澱粉酶活性分別為 2.05、3.74、3.57、4.05 及 6.37，試驗組腸道之澱粉酶活性均較對照組高 ($p < 0.05$) (Table 5)。而脂肪酶活性方面，點帶石斑分別餵食含 (1) 對照組、(2) 添加異麥芽寡糖、(3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料 8 週，各組魚隻腸道之脂肪酶活性分別為 0.99、1.31、0.96、1.21 及 1.05，其中以 (2) 添加異麥芽寡糖及 (4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖組脂肪酶顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Table 5)。推測益生菌 *L. mesenteroides* B4、異麥芽寡糖及葡聚糖對於點帶石斑之澱粉消化能力的提升均有效果，而異麥芽寡糖及 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖則有助於提升點帶石斑對於脂肪之消化能力。

裏海鱒飼餵 *L. mesenteroides* (2×10^9 CFU/g) 50 天後，腸道中蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶活性明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Askarian *et al.*, 2011)。點帶石斑餵食添加益生菌 *Lactococcus lactis* 的飼料 (10^8 CFU/g) 60 天後，肝胰臟中蛋白酶活性明顯高於對照組 ($p < 0.05$)，澱粉酶及脂肪酶活性也有提高的趨勢，但與對照組並沒有明顯差異 ($p >$

Table 5 Respective specific amylase and lipase activities (U/mg protein) in the intestines of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) fed with control, isomaltooligosaccharide (0.15%), *Leuconostoc mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g), *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + isomaltooligosaccharide (0.15%), and *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + dextran (0.15%) supplemented diets for 8 weeks

Treatment	Amylase	Lipase
Control	2.05 ± 0.30 ^a	0.99 ± 0.03 ^a
Isomaltooligosaccharide	3.74 ± 1.27 ^b	1.31 ± 0.03 ^c
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B4	3.57 ± 1.10 ^b	0.96 ± 0.03 ^a
<i>L. mesenteroides</i> B4 + isomaltooligosaccharide	4.05 ± 0.65 ^b	1.21 ± 0.08 ^b
<i>L. mesenteroides</i> B4 + dextran	6.37 ± 0.22 ^c	1.05 ± 0.01 ^a

Values in the same column with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

0.05) (Sun *et al.*, 2012)。本研究點帶石斑飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 的飼料後，魚隻腸道中鹼性、中性及酸性蛋白酶與澱粉酶之活性顯著高於對照組 ($p < 0.05$)，與裏海鱒飼餵 *L. mesenteroides* 後，腸道中蛋白酶及澱粉酶活性明顯高於對照組 ($p < 0.05$)，及點帶石斑飼食添加益生菌 *L. lactis* 的飼料後，蛋白酶活性明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Askarian *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012) 之結果一致。

又，本試驗點帶石斑飼食益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組，腸道中鹼性、中性及酸性蛋白酶與澱粉酶之活性也顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。本研究點帶石斑飼食添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 的飼料後，魚隻腸道中脂肪酶之活性與對照組並無顯著差異 ($p > 0.05$)，與裏海鱒飼餵 *L. mesenteroides* 後，腸道中脂肪酶活性明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Askarian *et al.*, 2011) 之結果有差異。

魚隻成長及飼料利用提升的效益，可能來自益生菌誘導消化酵素增加活性 (Suzer *et al.*, 2008)，而有些益生菌可以分泌胞外消化酵素，有助於宿主的成長 (Skrodenyte-Arbačiauskienė, 2007)。益生菌使益生菌增殖，產生較強的消化酵素，包括：蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶等，這些酵素增加生物對於飼料中蛋白質、澱粉及脂肪的消化，提高飼料中營養物質之消化吸收的效率，因此魚隻成長較佳 (Tovar *et al.*, 2002)。

本研究顯示，點帶石斑分別飼餵 (3) 添加益

生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖飼料，蛋白酶活性顯著高於對照組，而體外試驗顯示，*L. mesenteroides* B4 並不會分泌蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶 (數據未顯示)，因此推測，*L. mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖有助於誘導石斑魚增加消化酵素活性，進而提高點帶石斑對於飼料中蛋白質、澱粉及脂肪之消化及吸收，有助於魚隻之成長，尤其是 (3) 添加益生菌 *L. mesenteroides* B4、(4) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 異麥芽寡糖及 (5) 益生菌 *L. mesenteroides* B4 + 葡聚糖組，魚隻之平均體重明顯高於對照組 ($p < 0.05$)。

參考文獻

- 黃美瑩、朱惠真、曾亮璋、許晉榮 (2017) 美洲大嘴鱸腸道中葡聚糖產生菌 (*Leuconostoc mesenteroides* B4) 之篩選。水產研究, 25(2): 23-33.
- Ai, Q., H. Xu, K. Mai, W. Xu, J. Wang and W. Zhang (2011) Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture, 317: 155-161.
- Allameh, S. K., H. Daud, F. M. Yusoff, C. R. Saad and A. Ideris (2012) Isolation, identification and characterization of *Leuconostoc mesenteroides* as a new probiotic from intestine of snakehead fish (*Channa striatus*). Afr. J. Biotechnol., 11(16): 3810-3816.

- Alvarez-González, C. A., M. Cervantes-Trujano, D. Tovar-Ramírez, D. E. Conklin, H. Nolasco, E. Gisbert and R. Piedrahita (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 31: 83-93.
- Askarian, F., A. Kousha, W. Salma and E. Ringø (2011) The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzymes activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquacult. Nutr.*, 17: 488-497.
- Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (S. Salminen, A. V. Wright and A. Ouwehand eds.), 3rd ed., Marcel Dekker, New York, 1-67.
- Balcázar, J. L. (2006) Selection and characterization of probiotic strains for the prevention of furunculosis in brown trout (*Salmo trutta fario*). PhD Thesis, University of Zaragoza, Spain.
- Balcázar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Gironés and J. L. Muzquiz (2007) Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 30(2): 111-118.
- Barari A., M. P. Sorki and R. M. Nazari (2015) Comparison of effects of different enzymic levels Immnowall and Premalac indices of growth, survival rate and body composition in *Cyprinus carpio*. *Int. J. Sci. Res.*, 5: 1199-1202.
- Bauer A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris and M. Turck (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45(4): 493-496.
- Caggianiello, G., M. Kleerebezem and G. Spano (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100: 3877-3886.
- Chen, H. L., Y. H. Lu, J. J. Lin and L. Y. Ko (2001) Effects of isomaltooligosaccharides on bowel functions and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *J. Am. Coll. Nutr.*, 20: 44-49.
- Cheng, A. L., T. M. Pan, H. P. Hung and C. J. Huang (2000) Intestinal microflora is improved by the feeding of an oligosaccharide containing soft drink in rats. *Nutr. Sci. J. (Taiwan)*, 25: 232-242.
- Chung, H. S., Y. B. Kim, S. L. Chun and G. E. Ji (1999) Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 25-32.
- Chung, C. H. and D. F. Day (2004) Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poult. Sci.*, 83(8): 1302-6.
- Desai, A. R., M. G. Links, S. A. Collins, G. S. Mansfield, M. D. Drew, A. G. Van Kessel and J. E. Hill (2012) Effects of plant-based diets on the distal gut microbiome of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 350: 134-142.
- EFSA (2011) Maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA J.*, 9: 1-82.
- EFSA (2012) Scientific opinion on guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.*, 10: 2740.
- El-Jenia R., M. El Boura, P. Calo-Mata, K. Bohme, I. C. Fernández-No, J. Barros-Velázquez and B. Bouhaouala-Zahar (2015) In vitro probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Can. J. Microbiol.*, 62: 1-12.
- Euzenat, O., A. Guibert and D. Combes (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Proc. Biochem.*, 32: 237-243.
- Garrigues, D. and G. Arevalo (1995) An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In *Swimming Through Troubled Waters: Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95* (C. L. Browdy and J.S. Hopkin, eds.), 53-59.
- Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Genc, M. A., E. Yilmaz, E. Genc and M. Aktas (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Isr. J. Aquacult. - Bamidgeh*, 59(1): 10-16.
- Geng, X., X. H. Dong, B. P. Tan, Q. H. Yang, S. Y. Chi, H. Y. Liu and X. Q. Liu (2011) Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish shellfish Immunol.*, 31: 400-406.

- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401-1412.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. Dalvi, V. Kumar and S. C. Mukherjee (2008) Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 31: 649-657.
- Hamada, S., T. Koga, T. Fujiwara and T. Ooshima (1984) Role of oligosaccharides in dental caries development. *Jpn. Soc. Starch Sci.*, 31: 83-91.
- He, S., G. Xu, Y. Wu, H. Weng and H. Xie (2003) Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. *Chinese Feed.*, 23: 14-15.
- Huang, M. Y., H. J. Ju, L. W. Tseng and C. J. Hsu (2017) Effects of a probiotic collected from fish's intestine and its dextran product on growth performance, immunity status, and pathogen resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Abstract Book of ISNFF 2017. The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods. October 22-25 2017, GSCO, Gunsan, Jeonbuk, Korea, p. 352.
- Huang, M. Y., H. J. Ju, L. W. Tseng and F. C. Wu (2018) The effect of a probiotic, *Leuconostoc mesenteroides* B4, and its dextran product on growth performance and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Asian-Pacific Aquaculture 2018, April 23-26 2018, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan.
- Itami, Y., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). The Third Asian Fisheries Forum, Asian Fisheries Society, Manila, 375-378.
- Jaber, N. and B. Masoumeh (2017) Effect of diets containing different levels of prebiotic Mito on the growth factors, survival, body composition, and hematological parameters in common carp *Cyprinus Carpio* Fry. *J. Mar. Biol. Aquacul.*, 3: 1-6.
- Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- Kanno, T. (1990) Some functional properties of so-called isomaltooligosaccharides and their applications to food industry. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, 37: 87-97.
- Kelly, W. J., R. V. Asmundson, G. L. Harrison and C. M. Huang (1995) Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains from fermented rice cake (puto) using pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 26(3): 345-52.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan and L. Gibson (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.
- Kim D. H. and B. Austin (2008) Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47(3): 141-147.
- Kohmoto, S., F. Fukui, H. Takaku, Y. Machida, M. Arai and T. Mitsuoka (1988) Effect of isomaltooligosaccharides on human fecal flora. *Bifidobact. Microflora*, 7: 61-69.
- Kohmoto, T., F. Fukui, H. Takaku and T. Suoka (1991) Dose-response test of isomaltooligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 2157-2159.
- Korakli, M. and R. F. Vogel (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycanucrases and therapeutic potential of their synthesized glycans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71: 790-803.
- Kosin, B. and S. K. Rakshit (2010) Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous probiotics for application to white shrimp feed. *Aquaculture*, 306: 302-309.
- Kothari, D., D. Das, S. Patel and A. Goyal (2015a) Dextran and food application. In *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (K. G. Ramawat and J. M. Mérillon eds.), Springer International Publishing, 735-752.
- Kothari, D., J. M. R. Tingirikari and A. Goyal (2015b) *In vitro* analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.*, 6: 55-61.
- Leemhuis, H., T. Pijning, J. M. Dobruchowska, S. S. van Leeuwen, S. Kralj, B. W. Dijkstra and L. Dijkhuizen (2013) Glucanucrases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food

- applications. *J. Biotechnol.*, 163: 250-272.
- Li, J., B. Tan and K. Mai (2009) Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 291(1-2): 35-40.
- Lin, S. D. and C. C. Lee (2005) Qualities of chiffon cake prepared with indigestible dextrin and sucralose as replacement for sucrose. *Cereal Chem.*, 82: 405-413.
- Liu, S. F., Y. S. Ling and C. M. E. Tsai (1994) Biotechnically synthesized oligosaccharides and polydextrose reduce constipation and putrefactive metabolites in the human. *Nutr. Sci. J. (Taiwan)*, 19: 221-232.
- Liu, S. F. and C. M. E. Tsai (1995) Effects of biotechnically synthesized oligosaccharides and polydextrose on serum lipids in the human. *Nutr. Sci. J. (Taiwan)*, 20: 1-12.
- Mahghani, F., A. Gharaei, M. Ghaffari and R. Akrami (2014) Dietary synbiotic improves the growth performance, survival and innate immune response of Gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) juveniles. *Int. J. Aquat. Biol.*, 2(2): 99-104.
- Mahious, A. S., F. J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler and F. Ollevier (2006) Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquaculture Int.*, 14: 219-229.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203.
- Mehrabi, Z., F. Firouzbakhsh and A. Jafarpour (2012) Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*, 96(3): 474-481.
- Mehrabi, F., M. K. Khaledi and K. Hazaie (2018) Effects of pre- and probiotics on growth, survival, body composition, and hematology of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fry from the Caspian Sea. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.*, 18: 597-602.
- Meybodi, N. M. and M. A. Mohammadifar (2015) Microbial exopolysaccharides: a review of their function and application in food sciences. *J. Food Qual. Hazards Control*, 2: 112-117.
- Nácher-Vázquez, M., N. Ballesteros, Á. Canales, S. R. Saint-Jean, S. I. Pérez-Prieto, A. Prieto, R. Aznar and P. López (2015) Dextrins produced by lactic acid bacteria exhibit antiviral and immunomodulatory activity against salmonid viruses. *Carbohydr. Polym.*, 124: 292-301.
- Nakakuki, T. (2005) Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan. *J. Appl. Glycosci.*, 52: 267-271.
- Nayak, S. K. (2010) Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2-14.
- Oh, S., S. H. Kim and R. W. Worobo (2000) Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, 83: 2747-2752.
- Pérez-Sánchez, T., J. L. Balcázar, Y. García, N. Halaihel, D. Vendrell, I. de Blas, D. L. Merrifield and I. Ruiz-Zarzuela (2011) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.*, 34: 499-507.
- Pinsirodon, P. and K. L. Parkin (2001) Lipase essays In: Current protocols in food analytical chemistry (Wrolstad, R. E.). John Wiley & Sons, Inc. C3.1.1-C3.1.13.
- Robertsen, B., R. E. Ehgstad and J. B. Jorgensen (1994) β -glucan as immunostimulants in fish. In *Modulators of Fish Immune Response* (Vol. 1): Models for Environmental Toxicology/Biomarkers Immunostimulators (J. S. Stolen and T. C. Fletcher eds.), SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA, 83-99.
- Rodriguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga, H. Fushimi and J. Sweetman (2009) Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharides and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult. Sci.*, 57: 609-617.
- Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto and T. Mattila-Sandholm (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, 84: 197-215.
- Sarbini, S. R., S. Kolida, E. R. Deaville, G. R. Gibson and R. A. Rastall (2014) Potential of novel dextran oligosaccharides as prebiotics for obesity management through *in vitro* experimentation. *Brit.*

- J. Nutr., 112: 1303-1314.
- Shan, X. J., W. Huang, L. Cao, Z. Z. Xiao and S. Z. Dou (2009) Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miyu croaker *Miichthys miyu* larvae. Fish Physiol. Biochem., 35(3): 385-398.
- Shih, I. L., Y. T. Yu, C. J. Shieh and C. Y. Hsieh (2005) Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. J. Agric. Food Chem., 53: 8211-8215.
- Shukla, R. and A. Goyal (2013) Novel dextran from *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 isolated from fermented cucumber with anti-cancer properties. Int. J. Biol. Macromol., 62: 352-357.
- Shukla, R., I. Iliev and A. Goyal (2014) *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 as probiotic and its dextran with anticancer properties. J. BioSci. Biotechnol., 3: 79-87.
- Skrodenyte-Arbačiauskienė, V. (2007) Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus*. Fish. Sci., 73: 964-966.
- Staykov, Y., P. Spring, S. Denev and J. Sweetman (2007) Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquacult. Int., 15:153-161.
- Sun, Y. Z., H. L. Yang, R. L. Ma, K. Song and J. S. Li (2012) Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*. Aquacult. Nutr., 18: 281-289.
- Suzer, C., D. Coban, H.O. Kamaci, S. Saka, K. Firat, Ö. Otgucuoglu and H. Kücuksari (2008) *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280: 140-145.
- Syed Raffiq Ali, S., K. Ambasankar, P. Ezhil Praveena, S. Nandakumar and J. Syamadaya (2017) Effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on growth, body composition, hematological and immunological parameters of Asian seabass (*Lates calcarifer*). Aquacult. Int., 25: 837-848.
- Tang, S. G. H., C. C. Sieo, Chin, K. Ramasamy, W. Z. Saad, H. K. Wong and Y. W. Ho (2017) Performance, biochemical and haematological responses, and relative organ weights of laying hens fed diets supplemented with prebiotic, probiotic and synbiotic. BMC Vet. Res., 13: 248-260.
- Tingirikari, J. M. R., D. Kothari and A. Goyal (2014) Superior prebiotic and physicochemical properties of novel dextran from *Weissella cibaria* JAG8 for potential food applications. Food Funct., 5: 2324-2330.
- Torino, M. I., G. Font de Valdez and F. Mozzi (2015) Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. Frontiers Microbiol., 6: 834. doi:10.3389/fmicb.2015.00834.
- Torrecillas, S., A. Makol, M. J. Caballero, D. Montero, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort and M. S. Izquierdo (2007) Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. Fish Shellfish Immunol., 23: 969-981.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and R. Lésel (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture, 204:113-123.
- Tucker, J. W. Jr and S. Kennedy (2001) Snook culture. Aquaculture 2001, Book of abstract. p. 651. World Aquaculture Society, USA.
- Vendrell, D., J. L. Balcázar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés and J. L. Múzquiz (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. Comp. Immunol. Microb., 31: 337-345.
- Wang, H. F., P. S. Lim, M. D. Kao, E. C. Chan, L. C. Lin and N. P. Wang (2001) Use of isomaltooligosaccharide in the treatment of lipid profiles and constipation in hemodialysis patients. J. Renal Nutr., 11: 73-79.
- Wang, Y. B., Z. Q. Tian, J. T. Yao and W. F. Li (2008) Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture, 277: 203-207.
- Wang, X. X., P. X. Song, H. Wu, J. X. Xue, X. Zhong and L. Y. Zhang (2016) Effects of graded levels of isomaltooligosaccharides on the performance, immune function and intestinal status of weaned pigs. Asian Australas. J. Anim. Sci., 29(2): 250-256.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhancement of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by β -1,3-glucans. Nippon Suisan Gakk., 55: 1815-1819.
- Ye, J. D., K. Wang, F. D. Li and Y. Z. Sun (2011) Single or combined effects of fructo- and mannan

- oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr.*, 17: 902-911.
- Yilmaz, E., M. A. Genc and E. Genc (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Isr. J. Aquacult.* –Bamidgeh, 59(3): 182-188.
- Zapata, A. A. and M. Lara-Flores (2012) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Nile tilapia intestine (*Oreochromis niloticus*). *J. Biol. Life Sci.*, 4(1): 164-171.
- Zhang, W. F., D. F. Li, W. Q. Lu and G. F. Yi (2003) Effects of isomalto-oligosaccharides on broiler performance and intestinal microflora. *Poult. Sci.*, 82(4): 657-663.
- Zhang, Q., B. P. Tan, K. S. Mai, W. B. Zhang, H. M. Ma, Q. H. Ai, X. J. Wang and Z. G. Liufu (2011) Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquac. Res.*, 42: 943-952.
- Zubaidah, A., Yuhana, M. and Widanarni (2015) Encapsulated synbiotic dietary supplementation at different dosages to prevent vibriosis in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Hayati J. Biosci.*, 22(4): 163-168.

The Effect of the Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* B4, and Its Isomaltooligosaccharide and Dextran Products on the Growth Performance of Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

Mei-Ying Huang¹, Huei-Jen Ju^{2*} and Liang-Wei Tseng²

¹Marine Fisheries Division, Fisheries Research Institute

²Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The sensitivities of the probiotic *Leuconostoc mesenteroides* B4 to low pH, high salt bile concentrations and various antibiotics were tested, as were the effects of the probiotic and its isomaltooligosaccharide and dextran products on the growth performance and digestive enzymes of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. *L. mesenteroides* B4 was able to survive and grow in pH 2 and 1.0% bile salt. To test the sensitivity of the *L. mesenteroides* B4, 15 different antibiotics were used. The *L. mesenteroides* B4 exhibited at least some sensitivity to 11 of the antibiotics tested. Orange-spotted grouper were fed (1) control, (2) isomaltooligosaccharide (0.15%), (3) *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g), (4) *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + isomaltooligosaccharide (0.15%), or (5) *L. mesenteroides* B4 (10^7 CFU/g) + dextran (0.15%) supplemented diets for up to 8 weeks. The mean final weights of the spotted grouper fed with (3) *L. mesenteroides* B4, (4) *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide, and (5) *L. mesenteroides* B4 + dextran in their diets were significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$). The mean percent weight gains of the spotted grouper fed with (3) *L. mesenteroides* B4 and (4) isomaltooligosaccharide + *L. mesenteroides* B4 in their diets were also significantly higher than that of the control group ($p < 0.05$). The alkaline, neutral, and acid protease activities in the digestive tracts of the fish fed diets with (3) *L. mesenteroides* B4, (4) *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide, and (5) *L. mesenteroides* B4 + dextran were significantly increased over those in the digestive tracts of the control group fish ($p < 0.05$). The amylase activities in the digestive tracts of the fish fed with the experimental diets were also significantly increased over those in the digestive tracts of the control group fish ($p < 0.05$). Furthermore, the lipase activities in the digestive tracts of the fish fed diets with (2) isomaltooligosaccharide and (4) *L. mesenteroides* B4 + isomaltooligosaccharide were also significantly increased over those in the digestive tracts of the control group fish ($p < 0.05$). Overall, the results of this study indicate that dietary *L. mesenteroides* B4 and its isomaltooligosaccharide and dextran products could provide an effective method for enhancing the growth performance of orange-spotted grouper.

Key words: orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, probiotic *Leuconostoc mesenteroides* B4, isomaltooligosaccharide, dextran, growth performance, digestive enzyme

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2463-3101 ext. 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjeng@ mail.tfrin.gov.tw